



PCT
WELTORGANISATION FÜR GEISTIGES EIGENTUM
Internationales Büro
INTERNATIONALE ANMELDUNG VERÖFFENTLICH NACH DEM VERTRAG ÜBER DIE
INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES PATENTWESENS (PCT)

(51) Internationale Patentklassifikation 5 : C07K 7/06, 7/08, 7/10 C07K 7/56, 7/64 // A61K 37/02		A1	(11) Internationale Veröffentlichungsnummer: WO 90/06946 (43) Internationales Veröffentlichungsdatum: 28. Juni 1990 (28.06.90)
(21) Internationales Aktenzeichen: PCT/EP89/01474 (22) Internationales Anmeldedatum: 2. Dezember 1989 (02.12.89)		(81) Bestimmungsstaaten: AT (europäisches Patent), BE (europäisches Patent), CH (europäisches Patent), DE (europäisches Patent), ES (europäisches Patent), FR (europäisches Patent), GB (europäisches Patent), IT (europäisches Patent), JP, LU (europäisches Patent), NL (europäisches Patent), SE (europäisches Patent), US.	
(30) Prioritätsdaten: P 38 41 761.8 12. Dezember 1988 (12.12.88) DE		Veröffentlicht <i>Mit internationalem Recherchenbericht.</i>	
(71) Anmelder (für alle Bestimmungsstaaten ausser US): BASF AKTIENGESELLSCHAFT [DE/DE]; Carl-Bosch-Strasse 38, D-6700 Ludwigshafen (DE).			
(72) Erfinder; und (75) Erfinder/Anmelder (nur für US) : BOEHM, Hans-Joachim [DE/DE]; Sinsheimer Strasse 18, D-6700 Ludwigshafen (DE). DAUM, Lothar [DE/DE]; Reiherstrasse 25, D-6701 Otterstadt (DE). HAUPT, Andreas [DE/DE]; Geibelstrasse 66, D-6700 Ludwigstrasse (DE). SCHMIED, Bernhard [DE/DE]; Taunusstrasse 20, D-6710 Frankenthal (DE). WALKER, Nigel [GB/DE]; Bergstrasse 5, D-6915 Dossenheim (DE). ZECHEL, Johann-Christian [DE/DE]; Friedrich-Weinbrenner-Strasse 3, D-6900 Heidelberg (DE).			

(54) Titel: NEW TNF PEPTIDES

(54) Bezeichnung: NEUE TNF-PEPTIDE

(57) Abstract

New peptides of formula X-A-B-Tyr-Y, in which A, B, X and Y have the meanings given in the description, are useful therapeutic agents. A process for producing them is also described.

(57) Zusammenfassung

Es werden Peptide der Formel: X-A-B-Tyr-Y, worin A, B, X und Y die in der Beschreibung angegebenen Bedeutungen besitzen, sowie deren Herstellung beschrieben. Die neuen Peptide eignen sich zur Bekämpfung von Krankheiten.

LEDIGLICH ZUR INFORMATION

Code, die zur Identifizierung von PCT-Vertragsstaaten auf den Kopfbögen der Schriften, die internationale Anmeldungen gemäss dem PCT veröffentlichen.

AT	Oesterreich	ES	Spanien	ML	Mali
AU	Australien	FI	Finnland	MR	Mauritanien
BB	Barbados	FR	Frankreich	MW	Malawi
BE	Belgien	GA	Gabon	NL	Niederlande
BF	Burkina Fasso	GB	Vereinigtes Königreich	NO	Norwegen
BG	Bulgarien	HU	Ungarn	RO	Rumänien
BJ	Benin	IT	Italien	SD	Sudan
BR	Brasilien	JP	Japan	SE	Schweden
CA	Kanada	KP	Demokratische Volksrepublik Korea	SN	Senegal
CF	Zentrale Afrikanische Republik	KR	Republik Korea	SU	Soviet Union
CG	Kongo	LJ	Liechtenstein	TD	Tschad
CH	Schweiz	LK	Sri Lanka	TG	Togo
CM	Kamerun	LUX	Luxemburg	US	Vereinigte Staaten von Amerika
DE	Deutschland, Bundesrepublik	MC	Monaco		
DK	Dänemark	MG	Madagaskar		

Neue TNF-Peptide

Beschreibung

5 Die Erfindung betrifft neue, vom Tumor Nekrose Faktor (TNF) abgeleitete Peptide, deren Herstellung und deren Verwendung als Arzneimittel.

Von Carswell et al. (Proc. Nati. Acad. Sci. USA 72, 3666, 1975) wurde berichtet, daß das Serum von Endotoxin-behandelten Tieren, die zuvor mit dem
10 Mycobacterien-Stamm Calmette-Guerin (BCG) infiziert worden waren, eine hämorrhagische Nekrose bei verschiedenen Tumoren in der Maus bewirkte. Diese Aktivität wurde dem Tumor Nekrose Faktor zugeschrieben. TNF zeigt auch eine zytostatische oder zytotoxische Wirkung gegenüber einer Vielzahl von transformierten Zelllinien in vitro, während normale menschliche und
15 tierische Zelllinien davon nicht betroffen werden (Lymphokine Reports Vol. 2, pp 235-275, Academic Press, New York, 1981). Kürzlich wurde die biochemische Charakterisierung und das Gen für menschlichen TNF beschrieben (Nature 312, 724, 1984; J. Biol. Chem. 260, 2345, 1985; Nucl. Acids Res. 13, 6361, 1985).

20

Aus diesen Daten läßt sich folgende Proteinstruktur für das reife humane TNF ableiten:

ValArgSerSerSerArgThrProSerAspLysProValAlaHisValValAlaAsnPro

25

GlnAlaGluGlyGlnLeuGlnTrpLeuAsnArgArgAlaAsnAlaLeuLeuAlaAsnGly

ValGluLeuArgAspAsnGlnLeuValValProSerGluGlyLeuTyrLeuIleTyrSer

30

GlnValLeuPheLysGlyGlnGlyCysProSerThrHisValLeuLeuThrHisThrIle

SerArgIleAlaValSerTyrGlnThrLysValAsnLeuLeuSerAlaIleLysSerPro

CysGlnArgGluThrProGluGlyAlaGluAlaLysProTrpTyrGluProIleTyrLeu

35

GlyGlyValPheGlnLeuGluLysGlyAspArgLeuSerAlaGluIleAsnArgProAsp

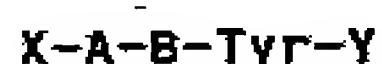
TyrLeuAspPheAlaGluSerGlyGlnValTyrPheGlyIleIleAlaLeu

40 Weiterhin wurde das TNF-Gen von Rind, Kaninchen und Maus beschrieben (Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol. 51, 597, 1986).

Neben seinen zytotoxischen Eigenschaften ist TNF einer der Hauptbeteiligten an entzündlichen Reaktionen (Pharmac. Res. 5, 129, 1988). Im Tiermodell konnte die Beteiligung von TNF beim septischen Schock (Science 229, 869, 1985) und der Graft versus Host Disease (J. Exp. Med. 166, 1280, 5 1987) gezeigt werden.

Es wurde nun gefunden, daß Peptide mit wesentlich geringerem Molekulargewicht günstige Eigenschaften besitzen.

10 Gegenstand der Erfindung sind Peptide der Formel I,



I,

worin

15

A Ser, Val, Ile oder Pro ist,

B Gln oder Ser bedeutet,

20 X für eine Gruppe G-NH-CHM-CO-, G-NH-CHM-CO-W-, G-R-NH-CHM-CO- oder G-R-NH-CHM-CO-W- und

Y für eine Gruppe -Z, -NH-CHQ-CO-Z, -V-NH-CHQ-CO-Z, -NH-CHQ-CO-U-Z oder -V-NH-CHQ-CO-U-Z steht,

25

wobei in X und Y

G ein Wasserstoffatom oder eine Aminoschutzgruppe bedeutet,

30 Z für eine OH- oder NH₂-Gruppe oder eine Carboxylschutzgruppe steht oder

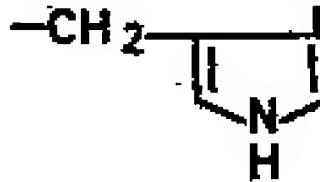
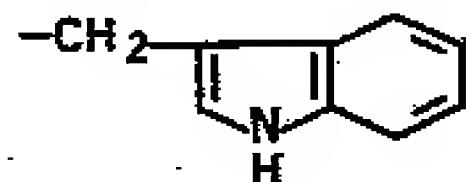
G und Z zusammen auch eine kovalente Bindung oder die Gruppe -CO-(CH₂)_a-NH- bedeuten, wobei a eine Zahl von 1 bis 12 ist,

35

R, U, V und W Peptidketten aus 1-4 natürlich vorkommenden α-Aminosäuren darstellen und

M und Q Wasserstoffatome oder eine der Gruppen

40 -CH(CH₃)₂, -CH(CH₃)-C₂H₅, -C₆H₅, -CH(OH)-CH₃,



oder -(CH₂)_b-T

(mit b in der Bedeutung einer Zahl von 1 bis 6 und T in der Bedeutung eines Wasserstoffatoms oder einer OH-, CH₃O-, CH₃S-, (CH₃)₂CH-, C₆H₅-, p-HO-C₆H₄-, HS-, H₂N-, HO-CO-, H₂N-CO-, H₂N-C(=NH)-NH-Gruppe) oder

5

M und Q zusammen eine -(CH₂)_c-S-S-(CH₂)_d-, -(CH₂)_e-CO-NH-(CH₂)_f- oder -(CH₂)_e-NH-CO-(CH₂)_g-NH-CO-(CH₂)_f-Brücke (mit c und d in der Bedeutung einer Zahl von 1 bis 4, e und f einer Zahl von 1 bis 6 und g einer Zahl von 1 bis 12) bedeuten,

10

sowie deren Salze mit physiologisch verträglichen Säuren.

Die Peptide der Formel I sind aus L-Aminosäuren aufgebaut, sie können aber 1 bis 2 D-Aminosäuren enthalten. Die Seitenketten der trifunktionellen 15 Aminosäuren können Schutzgruppen tragen oder ungeschützt vorliegen.

Als physiologisch verträgliche Säuren sind insbesondere zu nennen: Salzsäure, Zitronensäure, Weinsäure, Milchsäure, Phosphorsäure, Methansulfonsäure, Essigsäure, Ameisensäure, Maleinsäure, Fumarsäure, Äpfelsäure, Bernsteinsäure, Malonsäure, Schwefelsäure, L-Glutaminsäure, 20 L-Asparaginsäure, Brenztraubensäure, Schleimsäure, Benzoësäure, Glucuronsäure, Oxalsäure, Ascorbinsäure, Acetylglycin.

Die neuen Peptide können offenkettig (G = H, Aminoschutzgruppe; Z = OH, 25 NH₂, Carboxylschutzgruppe, M und Q nicht miteinander verbunden) und insbesondere Disulfid-verbrückt (G = H, Aminoschutzgruppe; Z = OH, NH₂, Carboxylschutzgruppe; M + Q = -(CH₂)_c-S-S-(CH₂)_d-), Seitenketten-verbrückt (G = H, Aminoschutzgruppe, Z = OH, NH₂, Carboxylschutzgruppe, M + Q = -(CH₂)_e-NH-CO-(CH₂)_f- oder -(CH₂)_e-NH-CO-(CH₂)_g-NH-CO-(CH₂)_f-) 30 oder Kopf-Schwanz-verknüpft (G + Z = kovalente Bindung oder -CO-(CH₂)_a-NH-) sein.

Die neuen Verbindungen lassen sich nach in der Peptidchemie bekannten Methoden herstellen.

35

So kann man die Peptide sequentiell aus Aminosäuren oder durch Fragment-verknüpfung geeigneter kleiner Peptide aufbauen. Beim sequentiellen Aufbau wird die Peptidkette beginnend am C-Terminus stufenweise um jeweils eine Aminosäure verlängert. Bei der Fragmentkupplung können Fragmente 40 unterschiedlicher Länge miteinander verknüpft werden, wobei die Fragmente wiederum durch sequentiellen Aufbau aus Aminosäuren oder ihrerseits durch Fragmentkupplung gewonnen werden können. Die cyclischen Peptide werden nach Synthese der offenkettigen Peptide durch eine in hoher Verdünnung durchgeführte Cyclisierungsreaktion erhalten.

Sowohl beim sequentiellen Aufbau, als auch bei der Fragmentkupplung müssen die Bausteine durch Bildung einer Amidbindung verknüpft werden. Hierzu eignen sich enzymatische und chemische Methoden.

- 5 Chemische Methoden zur Amidbindungsbildung sind ausführlich behandelt bei Müller, Methoden der Organischen Chemie Vol XV/2, pp 1 - 364, Thieme Verlag, Stuttgart, 1974; Stewart, Young, Solid Phase Peptide Synthesis, pp 31 - 34, 71 - 82, Pierce Chemical Company, Rockford, 1984; Bodanszky, Klausner, Ondetti, Peptide Synthesis, pp 85 - 128, John Wiley & Sons, New York, 1976 und anderen Standardwerken der Peptidchemie. Besonders bevorzugt sind die Azidmethode, die symmetrische und gemischte Anhydridmethode, *in situ* erzeugte oder präformierte Aktivester und die Amidbindungsbildung mit Hilfe von Kupplungsreagenzien (Aktivatoren), insbesondere Dicyclohexylcarbodiimid (DCC), Diisopropylcarbodiimid (DIC),
10 1-Ethoxycarbonyl-2-ethoxy-1,2-dihydrochinolin (EEDQ), 1-Ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl)-carbodiimidhydrochlorid (EDCI), n-Propanphosphonsäureanhydrid (PPA), N,N-Bis(2-oxo-3-oxazolidinyl)amidophosphorsäurechlorid (BOP-Cl), Diphenylphosphorylazid (DPPA), Castro's Reagenz (BOP), 0-Benzotriazolyl-N,N,N',N'-tetramethyluronium-Salze (HBTU), 2,5-Di-
15 phenyl-2,3-dihydro-3-oxo-4-hydroxythiophendioxid (Steglichs Reagenz; HOTDO) und 1,1'-Carbonyl-diimidazol (CDI). Die Kupplungsreagenzien können allein oder in Kombination mit Additiven wie N,N'-Dimethyl-4-aminopyridin (DMAP), N-Hydroxybenzotriazol (HOEt), N-Hydroxybenzotriazin (HOEt), N-Hydroxysuccinimid (HOSu) oder 2-Hydroxypyridin eingesetzt werden.
20
25 Während bei der enzymatischen Peptidsynthese normalerweise auf Schutzgruppen verzichtet werden kann, ist für die chemische Synthese ein reversibler Schutz der an der Bildung der Amidbindung nicht beteiligten reaktiven funktionellen Gruppen der beiden Reaktionspartner erforderlich.
30 Bei den chemischen Peptidsynthesen werden drei literaturbekannte Schutzgruppentechniken bevorzugt: Die Benzyloxycarbonyl(Z)-, die t-Butyloxycarbonyl(Boc)- und die 9-Fluorenylmethyloxycarbonyl(Fmoc)-Schutzgruppentechnik. Bezeichnet ist jeweils die Schutzgruppe der α-Aminofunktion des kettenverlängernden Bausteines. Die Seitenketenschutzgruppen der trifunktionellen Aminosäuren werden so gewählt, daß sie nicht notwendigerweise zusammen mit der α-Aminoschutzgruppe abgespalten werden. Eine ausführliche Übersicht über Aminosäureschutzgruppen gibt Müller, Methoden der Organischen Chemie Vol XV/I, pp 20 - 906, Thieme Verlag, Stuttgart, 1974.
35
40 Die Bausteine, die dem Aufbau der Peptidkette dienen, können in Lösung, in Suspension oder nach einem ähnlichen Verfahren, wie es von Merrifield in J. Amer. Chem. Soc. 85, 2149, 1963 beschrieben ist, zur Reaktion gebracht werden. Besonders bevorzugt sind Verfahren, bei denen Peptide sequentiell oder durch Fragmentkupplung unter Verwendung der Z-, Boc- oder

Fmoc-Schutzgruppentechnik aufgebaut werden, wobei die Reaktionspartner in Lösung zur Reaktion gebracht werden, sowie Verfahren, bei denen, ähnlich der genannten Merrifield-Technik, ein Reaktionspartner an einen unlöslichen polymeren Träger (im folgenden auch Harz genannt) gebunden zur Reaktion gebracht wird. Dabei wird das Peptid typischerweise unter Verwendung der Boc- oder Fmoc-Schutzgruppentechnik sequentiell am polymeren Träger aufgebaut, wobei die wachsende Peptidkette am C-Terminus kovalent mit den unlöslichen Harzteilchen verbunden ist (vgl. Abb. 1 und 2). Diese Arbeitsweise erlaubt es, Reagentien und Nebenprodukte durch Filtration zu entfernen, die Umkristallisation von Zwischenprodukten wird somit überflüssig.

Die geschützten Aminosäuren können an beliebige geeignete Polymerisate gebunden werden, die lediglich in den verwendeten Lösungsmitteln unlöslich sein und eine beständige physikalische Form, die leichte Filtration ermöglicht, aufweisen müssen. Das Polymerisat muß eine funktionelle Gruppe enthalten, an die die erste geschützte Aminosäure durch eine kovalente Bindung fest gebunden werden kann. Für diesen Zweck eignen sich die verschiedensten Polymerisate, z.B. Cellulose, Polyvinylalkohol, Polymethacrylat, sulfonierte Polystyrol, chlormethyliertes Copolymerisat von Styrol und Divinylbenzol (Merrifield-Harz), 4-Methylbenzhydrylamin-Harz (MBHA-Harz), Phenylacetamidomethyl-Harz (Pam-Harz), p-Benzoyloxybenzyl-alkohol-Harz, Benzhydrylamin-Harz (BHA-Harz), 4-(Hydroxymethyl)-benzoyloxymethyl-Harz, Harz nach Breipohl et al. (Tetrahedron Lett. 28, 565, 25 1987; Fa. BACHEM), HYCRAM-Harz (Fa. ORPEGEN) oder SASRIN-Harz (Fa. BACHEM).

Für die Peptidsynthese in Lösung eignen sich alle Lösungsmittel, die sich unter den Reaktionsbedingungen als inert erweisen, insbesondere Wasser, 30 N,N'-Dimethylformamid (DMF), Dimethylsulfoxid (DMSO), Acetonitril, Dichlormethan (DCM), 1,4-Dioxan, Tetrahydrofuran (THF), N-Methyl-2-pyrrolidon (NMP) sowie Gemische der genannten Lösungsmittel. Die Peptidsynthese am polymeren Träger kann in allen inerten organischen Lösungsmitteln, in denen die verwendeten Aminosäurederivate löslich sind, durchgeführt 35 werden; bevorzugt sind jedoch Lösungsmittel, die zusätzlich harzquellende Eigenschaften besitzen, wie DMF, DCM, NMP, Acetonitril und DMSO, sowie Gemische dieser Lösungsmittel.

Nach erfolgreicher Synthese wird das Peptid vom polymeren Träger 40 abgespalten. Die Bedingungen, unter denen sich die verschiedenen Harztypen abspalten lassen, sind literaturbekannt. Am häufigsten finden saure und Palladium-katalysierte Spaltreaktionen Anwendung, insbesondere die Spaltung in flüssigem wasserfreiem Fluorwasserstoff, in wasserfreier Trifluormethansulfonsäure, in verdünnter oder konzentrierter

Trifluoressigsäure oder die Palladium-katalysierte Spaltung in THF oder THF-DCM-Gemischen in Anwesenheit einer schwachen Base wie z.B. Morpholin. Je nach Wahl der Schutzgruppen können diese unter den Spaltbedingungen erhalten bleiben oder ebenfalls abgespalten werden. Auch eine teilweise 5 Entschützung des Peptids kann sinnvoll sein, wenn bestimmte Derivatisierungsreaktionen oder eine Cyclisierung durchgeführt werden sollen.

Die neuen Peptide zeigen zum Teil gute zytotoxische Eigenschaften. Ein anderer Teil der Peptide besitzt eine hohe Affinität für den zellulären 10 TNF-Rezeptor, ohne jedoch eine zytotoxische Aktivität zu besitzen. Sie stellen also TNF-Antagonisten dar. Sie binden in Konkurrenz zu natürlichem TNF an den zellulären TNF-Rezeptor und unterdrücken so die TNF-Wirkung. Die neuen Peptide erweisen sich als wertvolle Arzneimittel, die zur Behandlung von neoplastischen Erkrankungen und Autoimmunerkrankungen sowie 15 zur Bekämpfung und Prophylaxe von Infektionen, Entzündungen und Abstoßungsreaktionen bei Transplantationen eingesetzt werden können. Durch einfache Experimente kann geklärt werden, welche Wirkungsweise die einzelnen Peptide besitzen. Mit einer TNF-sensitiven Zelle wird die Zytotoxizität des Peptids durch Inkubation der Zelllinie in Gegenwart des 20 Peptids bestimmt. In einem zweiten Versuchsanansatz inkubiert man die Zelllinie mit dem entsprechenden Peptid in Gegenwart einer letal wirkenden TNF-Menge. Dadurch kann die TNF-antagonisierende Wirkung nachgewiesen werden. Außerdem wird durch ein in vitro Bindungsexperiment die Affinität des Peptids zum zellulären TNF-Rezeptor bestimmt.

25

Die biologische Charakterisierung der neuen Peptide auf ihre agonistische oder antagonistische Wirkung erfolgte in folgenden Testsystemen:

Zytotoxizitätstest auf TNF-sensitiven Indikatorzellen,

30 I.

Kompetition-Zytotoxizitätstest auf TNF-sensitiven

II.

Indikatorzellen,

III. Kompetition-Rezeptorbindungstest auf TNF-Rezeptor exprimierenden 35 Indikatorzellen.

I. Zytotoxizitätstest

Die agonistische Bewertung der neuen Peptide basiert auf deren 40 zytotoxischer Wirkung auf TNF-sensitiven Zellen (z.B. L929, MCF-7, A204, U937). Der Test mit L929 und MCF-7 wurde wie folgt durchgeführt:

1. 100 µl Kulturmedium mit 3 bis 5 x 10³ frisch trypsinisierten, sich im exponentiellen Wachstum befindenden L929-Zellen (Maus) bzw. MCF-7-Zellen (Mensch) wurden in die Vertiefungen einer 96-Loch-Flachboden-Kulturplatte pipettiert. Die Platte wurde über 5 Nacht bei 37°C im Brutschrank inkubiert. Die mit Wasserdampf gesättigte Luft im Brutschrank enthielt 5 Vol% CO₂.

Das L929-Kulturmedium enthielt 500 ml MEM Earle 1x (Boehringer, Mannheim), 50 ml hitzeinaktiviertes (30 min, 56°C) foetales Kälberserum (FCS), 50 ml L-Glutamin (200 mM), 5 ml 100x nichtessentielle Aminosäuren, 3 ml 1M Hepes-Puffer pH 7,2 und 50 ml Gentamycin (50 mg/ml).

10 Das MCF-7-Kulturmedium enthielt 500 ml MEM Dulbecco 1x (Boehringer, Mannheim), 100 ml hitzeinaktiviertes (30 min, 56°C) FCS, 5 ml L-Glutamin und 5 ml 100x nichtessentielle Aminosäuren.

15 2. Am folgenden Tag wurden 100 µl der zu prüfenden Peptid-Lösung zu den Zellkulturen gegeben und seriell 2-fach titriert. Zusätzlich wurden einige Zellkontrollen (d.h. nicht mit Peptid-Verdünnung behandelte Zellkulturen) und einige rhu-TNF-Kontrollen (d.h. mit rekombinanten humanen TNF behandelte Zellkulturen) mit angelegt. Die Kulturplatte wurde 48 h bei 37°C in einer Atmosphäre aus wasserdampf-gesättigter Luft mit 5 Vol.% CO₂ inkubiert.

20 25 3. Der Prozentsatz Überlebender Zellen in den mit Peptid-Verdünnung behandelten Kulturen wurde mittels der Kristallviolettfärbung bestimmt. Dazu wurden die Flüssigkeiten aus den Vertiefungen durch Abschlagen der Testplatte entfernt. In jede Vertiefung wurden 50 µl Kristallviolettlösungen pipettiert.

30 Die Kristallviolettlösung hatte folgende Zusammensetzung:

35 3,75 g Kristallviolett
1,75 g NaCl
161,5 ml Ethanol
43,2 ml 37 % Formaldehyd
ad 500 ml Wasser

40 Die Kristallviolettlösung blieb 20 min in den Vertiefungen und wurde dann ebenfalls abgeschlagen. Anschließend wurden die Platten jeweils 5 mal durch Eintauchen in Wasser gewaschen, um

den nicht zellgebundenen Farbstoff zu entfernen. Der zellgebundene Farbstoff wurde durch Zugabe von 100 µl Reagenzlösung (50 % Ethanol, 0,1 % Eisessig, 49,9 % Wasser) in jede Vertiefung aus den Zellen extrahiert.

5

4. Durch Schütteln der Platten für 5 min erhält man in jeder Vertiefung eine gleichmäßig gefärbte Lösung. Zur Bestimmung der Überlebenden Zellen wurde die Extinktion der Färbelösung in den einzelnen Vertiefungen bei 540 nm gemessen.

10

5. Danach wurde, bezogen auf die Zellkontrolle, der 50 % Zytotoxizitätswert definiert und der Kehrwert der Probenverdünnung, die zu 50 % Zytotoxizität führt, als zytotoxische Aktivität der untersuchten Probe ermittelt.

15

II. Kompetition-Zytotoxizitätstest

Die antagonistische Bewertung der Peptide basiert auf deren Eigenschaft, die zytotoxische Wirkung von rhu-TNF auf TNF-sensitiven Zellen (z.B. L929, MCF-7, A204, U937) zu kompetitieren. Der Kompetition-Zytotoxizitätstest mit L929 und MCF-7-Zellen wurde wie folgt durchgeführt:

1. 100 µl Kulturmedium mit 3 bis 5 x 10³ frisch trypsinisierten, sich im exponentiell Wachstum befindenden L929-Zellen (Maus) bzw. MCF-7-Zellen (Mensch) wurden in die Vertiefungen einer 96-Loch-Flachboden-Kulturplatte pipettiert. Die Platte wurde über Nacht bei 37°C im Brutschrank inkubiert. Die mit Wasserdampf gesättigte Luft im Brutschrank enthielt 5 Vol% CO₂.

30

Das L929-Kulturmedium enthielt 500 ml MEM Earle 1x (Boehringer, Mannheim), 50 ml für 30 min bei 56°C hitzeinaktiviertes FCS, 5 ml L-Glutamin (200 mM), 5 ml 100x nichtessentielle Aminosäuren, 3 ml 1M Hepes-Puffer pH 7,2 und 500 µl Gentamycin (50 mg/ml).

35

Das MCF-7-Kulturmedium enthielt 500 ml MEM Dulbecco 1x (Boehringer, Mannheim), 100 ml hitzeinaktiviertes (30 min, 56°C) FCS, 5 ml L-Glutamin (200 mM) und 5 ml 100x nichtessentielle Aminosäuren.

40

2. Am nächsten Tag wurden 100 µl der zu prüfenden Peptid-Lösung zu den Zellkulturen zugegeben und seriell 2-fach titriert. Zu diesen Zellkulturen wurden dann 100 µl einer rhu-TNF-Verdünnung in Kulturmedium, die in der Endkonzentration in der Zellkultur eine

80-100 % zytotoxische Wirkung hat, zugegeben. Zudem wurden einige Zellkontrollen (d.h. nicht mit Peptid-Lösung und nicht mit rhu-TNF-Lösung behandelte Zellkulturen) und einige rhu-TNF-Kontrollen (=nur mit rhu-TNF-Lösung behandelte Zellkulturen) mit angelegt. Die Kulturplatte wurde dann 48 h bei 5 37°C in einer Atmosphäre aus wasserdampf-gesättigter Luft mit 5 Vol.% CO₂ inkubiert.

10 3. Der Prozentsatz überlebender Zellen in den mit Substanzlösung behandelten Kulturen wurde mittels der Kristallviolettfärbung bestimmt. Dazu wurden die Flüssigkeiten aus den Vertiefungen durch Abschlagen der Testplatte entfernt. In jede Vertiefung wurden 50 µl Kristallviolettlösungen pipettiert.

15 15 Die Kristallviolettlösung hatte die in II.3 angegebene Zusammensetzung.

20 Die Kristallviolettlösung blieb 20 min in den Vertiefungen und wurde dann ebenfalls abgeschlagen. Anschließend wurden die Platten jeweils 5 mal durch Eintauchen in Wasser gewaschen, um den nicht zellgebundenen Farbstoff zu entfernen. Der zellgebundene Farbstoff wurde durch Zugabe von 100 µl Reagenzlösung (50 % Ethanol, 0,1 % Eisessig, 49,9 % Wasser) in jede Vertiefung aus den Zellen extrahiert.

25 4. Durch Schütteln der Platten für 5 min erhielt man in jeder Vertiefung eine gleichmäßig gefärbte Lösung. Zur Bestimmung der Überlebenden Zellen wurde die Extinktion der Färbelösung in den einzelnen Vertiefungen bei 540 nm gemessen.

30 30 5. Danach wurde, bezogen auf die Zellkontrolle und die rhu-TNF-Kontrolle der 50 % Kompetitions Wert definiert und die Probenkonzentration, die bei der vorgelegten rhu-TNF-Konzentration zu 50 % Kompetition der rhu-TNF-Zytotoxität führt, als antagonistische Aktivität der untersuchten Probe ermittelt.

III. Kompetition-Rezeptorbindungstest

40 Sowohl die agonistische als auch die antagonistische Wirkung von Peptiden setzt voraus, daß letztere an den TNF-Rezeptor binden. Das bedeutet, daß Peptide mit agonistischer bzw. antagonistischer Wirkung und rhu-TNF um die Bindung am TNF-Rezeptor auf TNF-sensitiven Indikatorzellen (z.B. U937) konkurrieren. Der Kompetition-Rezeptor-bindungstest wurde wie folgt durchgeführt:

1. 100 µl Medium mit verschiedenen Konzentrationen des zu prüfenden Peptids sowie des rhu-TNF (=Kontrolle) wurden in die Reaktionsgefäße pipettiert. Das Medium enthielt 500 ml PBS (Boehringer; Mannheim), 10 ml hitzeinaktiviertes (30 min, 56°C) FCS und 100 mg Natriumazid.
5
2. Anschließend wurden 100 µl Medium mit 1 ng ¹²⁵Iod-markiertem rhu-TNF (Lactoperoxidase-Methode nach Bolton) in die Reaktionsgefäße gegeben und gemischt. Zur Bestimmung der unspezifischen Bindung (NSB) wurde in den Reaktionsgefäßten das ¹²⁵Iod-markierte rhu-TNF (1 ng ¹²⁵I-rhu-TNF in 100 µl Medium) mit dem 200-fachen Überschuß an nicht radioaktiv markiertem rhu-TNF (200 ng rhu-TNF in 100 µl Medium) gemischt.
10
3. Dann wurden 100 µl Medium mit 2 x 10⁶ U937-Zellen (Mensch) in die Reaktionsgefäße pipettiert und gemischt. Die Reaktionsgefäße (Testvolumen 300 µl) wurden 90 min bei 0°C inkubiert. Nach 45 min wurden die Reaktionsansätze nochmals durchmischt.
15
4. Nach der Inkubationszeit wurden die Zellen 5 min bei 1800 rpm und 4°C zentrifugiert, 3 mal mit Medium gewaschen, quantitativ in Zählröhrchen überführt und die zellgebundene Radioaktivität in einem Clint Gamma Counter 1272 (LKB Wallac) bestimmt.
20
5. Nach Korrektur der Meßwerte um die unspezifische Bindung wurde, bezogen auf die Gesamtbindung, der 50 % Kompetitions Wert definiert und die Probenkonzentration, die bei der vorgelegten ¹²⁵I-rhu-TNF-Konzentration zu 50 % Kompetition der ¹²⁵I-rhu-TNF-Bindung führt, als kompetitive Aktivität der untersuchten Probe ermittelt.
25
30

Die folgenden Beispiele sollen die Erfindung näher erläutern. Die proteogenen Aminosäuren sind in den Beispielen mit dem bekannten Dreibuchstaben-Code abgekürzt. Darüber hinaus bedeuten:

35 Abs = 4-Aminobuttersäure, Ac = Essigsäure, Bal = β-Alanin,
Hcy = Homocystein, Hly = Homolysin, Orn = Ornithin,
Dap = 2,3-Diaminopropionsäure.

A. Allgemeine Arbeitsvorschriften

- 40 I. Die Synthese der Peptide gemäß Anspruch 1 erfolgte mit Hilfe der Standardmethoden der Festphasenpeptidsynthese an einem vollautomatischen Peptidsynthesizer Modell 430A der Firma APPLIED BIOSYSTEMS. Das Gerät benutzt für die Boc- und Fmoc-Schutzgruppentechnik unterschiedliche Synthesezyklen.

a) Synthesezyklus für die Boc-Schutzgruppentechnik

1. 30 % Trifluoressigsäure in DCM 1 x 3 min
 2. 50 % Trifluoressigsäure in DCM 1 x 17 min
 5 3. DCM-Waschschnitt 5 x 1 min
 4. 5 % Diisopropylethylamin in DCM 1 x 1 min
 5. 5 % Diisopropylethylamin in NMP 1 x 1 min
 6. NMP-Waschschnitt 5 x 1 min
 7. Zugabe der voraktivierten geschützten Aminosäure
 10 (Aktivierung durch 1 Äquivalent DCC und
 1 Äquivalent HOBr in NMP/DCM);
 Peptidkupplung (1. Teil) 1 x 30 min
 8. Zugabe von DMSO zur Reaktionsmischung bis zu
 einem Volumenanteil von 20 % DMSO
 15 9. Peptidkupplung (2. Teil) 1 x 16 min
 10. Zugabe von 3,8 Äquivalenten Diisopropylethylamin
 zur Reaktionsmischung
 11. Peptidkupplung (3. Teil) 1 x 7 min
 12. DCM-Waschschnitt 3 x 1 min
 20 13. bei unvollständigem Umsatz Wiederholung der
 Kupplung (zurück zu 5.)
 14. 10 % Essigsäureanhydrid, 5 % Diisopropylethylamin
 in DCM 1 x 2 min
 15. 10 % Essigsäureanhydrid in DCM 1 x 4 min
 25 16. DCM-Waschschnitt 4 x 1 min
 17. zurück zu 1.

b) Synthesezyklus für die Fmoc-Schutzgruppentechnik

- 30 1. NMP-Waschschnitt 1 x 1 min
 2. 20 % Piperidin in NMP 1 x 4 min
 3. 20 % Piperidin in NMP 1 x 16 min
 4. NMP-Waschschnitt 5 x 1 min
 5. Zugabe der voraktivierten geschützten Aminosäure
 35 (Aktivierung durch 1 Äquivalent DCC und
 1 Äquivalent HOBr in NMP/DCM);
 Peptidkupplung 1 x 61 min
 6. NMP-Waschschnitt 3 x 1 min
 7. bei unvollständigem Umsatz Wiederholung der
 40 Kupplung (zurück zu 5.)
 8. 10 % Essigsäureanhydrid in NMP 1 x 8 min
 9. NMP-Waschschnitt 3 x 1 min
 10. zurück zu 2.

II. Aufarbeitung der nach Ia erhaltenen Peptidharze

Das nach Ia erhaltene Peptidharz wurde im Vakuum getrocknet und in ein Reaktionsgefäß einer Teflon-HF-Apparatur (Fa. PENINSULA) transferiert.

5 Nach Zugabe eines Scavengers, vorzugsweise Anisol (1 ml/g Harz), sowie im Falle von tryptophanhaltigen Peptiden eines Thiols zur Entfernung der indolischen Formylgruppe, vorzugsweise Ethandithiol (0,5 ml/g Harz) wurde unter Kühlung mit flüssigem N₂ Fluorwasserstoff einkondensiert (10 ml/g Harz). Man ließ die Mischung sich auf 0°C erwärmen und
10 rührte 45 min bei dieser Temperatur. Anschließend wurde der Fluorwasserstoff im Vakuum abgezogen und der Rückstand mit Essigester gewaschen, um restlichen Scavenger zu entfernen. Das Peptid wurde mit 30 %iger Essigsäure extrahiert, filtriert und das Filtrat lyophilisiert.

15 Zur Herstellung von Peptidhydraziden wurde das Peptidharz (Pam- oder Merrifieldharz) in DMF suspendiert (15 ml/g Harz) und nach Versetzen mit Hydrazinhydrat (20 Äquivalente) 2 Tage bei Raumtemperatur gerührt. Zur Aufarbeitung wurde das Harz abfiltriert und das Filtrat zur
20 Trockene eingedampft. Der Rückstand wurde aus DMF/Et₂O oder MeOH/Et₂O kristallisiert.

III. Aufarbeitung der nach Ib erhaltenen Peptidharze

25 Das gemäß Ib erhaltene Peptidharz wurde im Vakuum getrocknet und anschließend in Abhängigkeit von der Aminosäurezusammensetzung einer der folgenden Spaltungsprozeduren unterworfen (Wade, Tregear, Howard Florey Fmoc-Workshop Manual, Melbourne 1985).

30

35

40

Das Peptid enthält			Spaltbedingungen		
Arg(Mtr)	Met	Trp	TFA	Scavenger	Reaktionszeit
nein	nein	nein	95 %	5 % H ₂ O	1,5 h
ja	nein	nein	95 %	5 % Thioanisol	≥ 3 h
nein	ja	nein	95 %	5 % Ethylmethyl-sulfid	1,5 h
nein	nein	ja	95 %	5 % Ehandithiol/ Anisol (1:3)	1,5 h
nein	ja	ja	95 %	5 % Ehandithiol/ Anisol/Ethyl-methylsulfid (1:3:1)	1,5 h
ja	ja	ja	93 %	7 % Ehandithiol/ Anisol/ Ethylmethyl-sulfid (1:3:3)	≥ 3 h

Die Suspension des Peptidharzes in der geeigneten TFA-Mischung wurde bei Raumtemperatur für die angegebene Zeit gerührt, danach wurde das Harz abfiltriert und mit TFA sowie DCM gewaschen. Das Filtrat und die Waschlösungen wurden weitgehend eingeengt und das Peptid durch Zugabe von Diethylether ausgefällt. Nach Abkühlung im Eisbad wurde der Niederschlag abfiltriert, in 30 % Essigsäure aufgenommen und lyophilisiert.

5

10 IV. Reinigung und Charakterisierung der Peptide

Die Reinigung erfolgte mittels Gelchromatographie (SEPHADEX® G-10, G-15/10 % HOAc; SEPHADEX® LH20/MeOH) und anschließender Mitteldruckchromatographie (Stationäre Phase: HD-SIL C-18, 20-45 μ, 100 Å; mobile Phase: Gradient mit A = 0,1 % TFA/MeOH, B = 0,1 % TFA/H₂O).

15

Die Reinheit der erhaltenen Endprodukte wurde mit analytischer HPLC (Stationäre Phase: 100 x 2,1 mm VYDAC C-18, 5 μ , 300 Å; mobile Phase = CH₃CN/H₂O-Gradient, gepuffert mit 0,1 % TFA, 40°C) bestimmt. Zur Charakterisierung wurden Aminosäureanalyse und Fast-Atom-Bombardment-Massenspektroskopie herangezogen.

B. Spezielle Arbeitsvorschriften

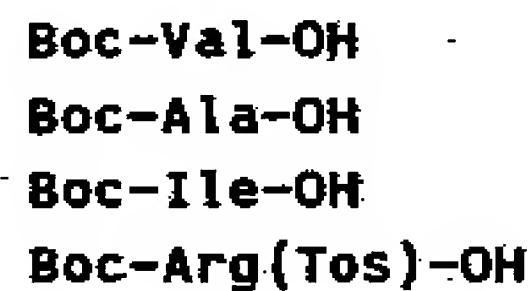
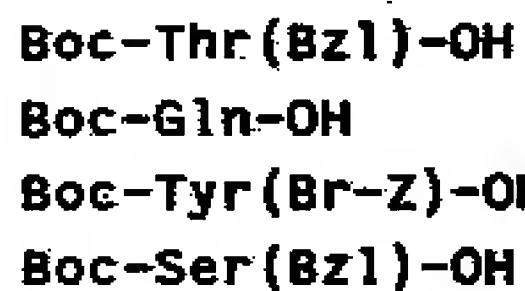
Beispiel 1

10



1,38 g Boc-Lys(Cl-Z)-p-MBHA-Harz (Substitution ~ 0,36 mmol/g), entsprechend einer Ansatzgröße von 0,5 mmol, wurden gemäß A1a mit je 2 mmol

15



20

umgesetzt.

Nach beendeter Synthese wurde das Peptidharz N-terminal entschützt (Ausführung der Schritte 1 - 3 gemäß A1a) und anschließend im Vakuum 25 getrocknet; die Ausbeute betrug 2,3 g.

1,15 g des so erhaltenen Harzes wurden einer HF-Spaltung gemäß AII unterworfen. Das Rohprodukt (195 mg) wurde durch Gelfiltration (SEPHADEX® G-10) und Mitteldruckchromatographie (vgl. AIV; 60 - 75 % A; 30 0,25 % min⁻¹) gereinigt. Es wurden 102 mg Reinprodukt erhalten.

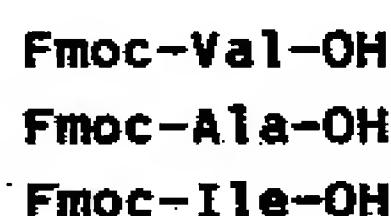
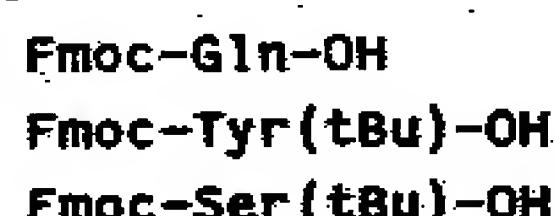
Beispiel 2



35

0,4 g Fmoc-Thr(t-Bu)-p-Alkoxybenzylalkoholharz (Substitution ~ 0,63 mmol/g), entsprechend einer Ansatzgröße von 0,25 mmol, wurden gemäß A1b mit je 1 mmol

40



umgesetzt.

Nach beendeter Synthese wurde der N-Terminus acetyliert (Ausführung der Schritte 2 - 4 und 8 - 9 gemäß AIIb). Das erhaltene Peptidharz wurde im Vakuum getrocknet; die Ausbeute betrug 0,6 g.

5 Das nach der TFA-Spaltung gemäß AIII erhaltene Rohpeptid (160 mg) wurde durch Gelfiltration (SEPHADEX® G - 10) und Mitteldruckchromatographie (vgl. AIV; 60 - 75 %; 0,25 % min⁻¹) gereinigt. Es wurden 87 mg Reinprodukt erhalten.

10 Analog Beispiel 1 und 2 lassen sich herstellen:

- 3. H-Ala-Val-Ser-Tyr-Gln-OH
- 4. Ac-Ala-Val-Ser-Tyr-Gln-OH
- 5. H-Ala-Val-Ser-Tyr-Gln-NH₂
- 15 6. Ac-Ala-Val-Ser-Tyr-Gln-NH₂
- 7. H-Ala-Val-Gln-Tyr-Gln-OH
- 8. Ac-Ala-Val-Gln-Tyr-Gln-OH
- 9. H-Ala-Val-Gln-Tyr-Gln-NH₂
- 10. Ac-Ala-Val-Gln-Tyr-Gln-NH₂
- 20 11. H-Ile-Ala-Val-Ser-Tyr-Gln-OH
- 12. Ac-Ile-Ala-Val-Ser-Tyr-Gln-OH
- 13. H-Ile-Ala-Val-Ser-Tyr-Gln-NH₂
- 14. Ac-Ile-Ala-Val-Ser-Tyr-Gln-NH₂
- 15. H-Phe-Ala-Val-Ser-Tyr-Gln-OH
- 25 16. Ac-Phe-Ala-Val-Ser-Tyr-Gln-OH
- 17. H-Phe-Ala-Val-Ser-Tyr-Gln-NH₂
- 18. Ac-Phe-Ala-Val-Ser-Tyr-Gln-NH₂
- 19. H-Ile-Ala-Val-Ser-Tyr-Gln-Thr-OH
- 20. Ac-Leu-Ala-Val-Ser-Tyr-Gln-Thr-OH
- 30 21. H-Ile-Ala-Val-Ser-Tyr-Gln-Thr-NH₂
- 22. Ac-Ile-Ala-Val-Ser-Tyr-Gln-Thr-NH₂
- 23. H-Phe-Ala-Val-Ser-Tyr-Gln-Thr-OH
- 24. Ac-Phe-Ala-Val-Ser-Tyr-Gln-Thr-OH
- 25. H-Phe-Ala-Val-Ser-Tyr-Gln-Thr-NH₂
- 35 26. Ac-Phe-Ala-Val-Ser-Tyr-Gln-Thr-NH₂
- 27. H-Arg-Ile-Ala-Val-Ser-Tyr-Gln-Thr-Lys-OH
- 28. Ac-Arg-Ile-Ala-Val-Ser-Tyr-Gln-Thr-Lys-OH
- 29. H-Arg-Leu-Ala-Val-Ser-Tyr-Gln-Thr-Lys-NH₂
- 30. Ac-Arg-Ile-Ala-Val-Ser-Tyr-Gln-Thr-Lys-NH₂
- 40 31. H-Ser-Arg-Ile-Ala-Val-Ser-Tyr-Gln-Thr-Lys-Val-Asn-OH
- 32. Ac-Ser-Arg-Ile-Ala-Val-Ser-Tyr-Gln-Thr-Lys-Val-Asn-OH
- 33. H-Ser-Arg-Ile-Ala-Val-Ser-Tyr-Gln-Thr-Lys-Val-Asn-NH₂

36. Ac-Ser-Arg-Ile-Ala-Val-Ser-Tyr-Gln-Thr-Lys-Val-Asn-NH₂
37. H-Ile-Ala-Val-Ser-Tyr-Asn-OH
38. Ac-Ile-Ala-Pro-Ser-Tyr-Gln-Thr-NH₂
39. H-Ile-Gly-Val-Ser-Tyr-Gln-Thr-OH
5 40. Ac-Arg-Ile-Ala-Val-Gln-Tyr-Gln-Thr-Lys-NH₂
41. Ac-Ser-Arg-Ile-Ala-Val-Ser-Tyr-Gln-Val-Lys-Val-Asn-NH₂

Beispiel 42

H-Cys-Ala-Val-Ser-Tyr-Cys-NH₂

0,98 g Boc-Cys(pMB)-MBHA-Harz (Substitution ~ 0,51 mmol/g), entsprechend 10 einer Ansatzgröße von 0,5 mmol wurden gemäß AIIa mit je 2 mmol

Boc-Tyr(Br-Z)-OH
Boc-Ser(Bzl)-OH
Boc-Val-OH

Boc-Ala-OH
Boc-Cys(pMB)-OH

15 umgesetzt.

Das Peptidharz wurde im Vakuum getrocknet; die Ausbeute betrug 1,5 g.

20 0,75 g des so erhaltenen Harzes wurden einer HF-Spaltung gemäß AII unter-
 -worfen. Das lyophilisierte Rohprodukt wurde in 2 l 0,1 %iger Essigsäure
 aufgenommen und der pH anschließend mit wässrigem Ammoniak auf 8,4 einge-
 stellt. Unter Argonatmosphäre wurde langsam 0,01 n $K_3[Fe(CN)_6]$ -Lösung
 zugetropft, bis die gelblich-grüne Färbung länger als 15 min bestehen
 25 blieb. Es wurde noch 1 h nachgeführt, dann mit Eisessig auf pH 4,5 ange-
 säuert und mit 15 ml einer wässrigen Suspension eines Anionenaustauschers
 (BIORAD® 3 x 4A, Chloridform) versetzt. Nach 30 min wurde das Ionenaus-
 tauschharz abfiltriert, das Filtrat am Rotationsverdampfer auf 100 ml
 eingeengt und anschließend lyophilisiert.

Alle benutzten Lösungsmittel wurden vorher mit Stickstoff gesättigt, um eventuelle Oxidation der freien Cysteinreste zu verhindern.

Das Rohprodukt wurde durch Gelchromatographie (SEPHADEX® G-15) und Mitteldruckchromatographie (vgl. AIV; 20 - 40 % A; $0,25 \text{ cm}^3 \text{ min}^{-1}$) gereinigt. Es wurden 18 mg Reinprodukt erhalten.

Analog Beispiel 42 lassen sich herstellen (zur Herstellung der Peptidsäuren wurde PAM-Harz verwendet):

43. H-Cys-Val-Ser-Tyr-Cys-OH
44. Ac-Cys-Val-Ser-Tyr-Cys-NH₂
45. H-Cys-Val-Ser-Tyr-Cys-NH₂
46. Ac-Cys-Ala-D-Val-Ser-Tyr-Cys-NH₂
47. H-Cys-Ala-D-Val-Ser-Tyr-Cys-NH₂
48. H-Cys-Val-Ser-Tyr-Gln-Cys-NH₂
49. Ac-Cys-Val-Ser-Tyr-Gln-Cys-NH₂
50. H-Cys-Val-D-Ser-Tyr-Gln-Cys-NH₂
51. Ac-Cys-Val-D-Ser-Tyr-Gln-Cys-NH₂
52. H-Cys-Val-D-Ala-Tyr-Gln-Cys-NH₂
53. Ac-Cys-Val-D-Ala-Tyr-Gln-Cys-NH₂
54. H-Cys-Ala-Val-Ser-Tyr-Cys-OH
55. Ac-Cys-Ala-Val-Ser-Tyr-Cys-NH₂
56. H-Hcy-Ala-Val-Ser-Tyr-Cys-OH
57. Ac-Hcy-Ala-Val-Ser-Tyr-Cys-NH₂
58. H-Hcy-Ala-Val-Ser-Tyr-Hcy-OH
59. Ac-Hcy-Ala-Val-Ser-Tyr-Hcy-NH₂
60. H-Cys-Ala-Val-Ser-Tyr-Gln-Cys-OH
61. H-Cys-Ala-Val-Ser-Tyr-Gln-Cys-NH₂
62. Ac-Cys-Ala-Val-Ser-Tyr-Gln-Cys-NH₂
63. Ac-Cys-Gly-Val-Ser-Tyr-Gln-Cys-NH₂
64. H-Cys-Ile-Ala-Val-Ser-Tyr-Gln-Cys-OH

65. Ac-Cys-Ile-Ala-Val-Ser-Tyr-Gln-Cys-NH₂
66. H-Hcy-Ile-Ala-Val-Ser-Tyr-Gln-Cys-OH
67. H-Cys-Val-Gly-Tyr-Gln-Cys-NH₂
68. Ac-Cys-Val-Gly-Tyr-Gln-Cys-NH₂
69. Ac-Hcy-Ile-Ala-Val-Ser-Tyr-Gln-Cys-NH₂
70. Ac-Cys-Val-Ser-Tyr-Gln-Thr-Lys-Cys-NH₂
71. Ac-Cys-Ala-Val-Ser-Tyr-Gln-Thr-Lys-Cys-NH₂
72. H-Cys-Ile-Ala-Val-Ser-Tyr-Gln-Thr-Lys-Cys-OH
73. Ac-Cys-Ile-Ala-Val-Ser-Tyr-Gln-Thr-Lys-Cys-NH₂
74. Ac-Cys-Arg-Ile-Ala-Val-Ser-Tyr-Gln-Thr-Lys-Cys-NH₂
75. H-Ile-Cys-Val-Ser-Tyr-Cys-Thr-OH
76. Ac-Ser-Arg-Cys-Ala-Val-Ser-Tyr-Cys-Thr-Lys-NH₂
77. Ac-Hcy-Ala-Ile-Ser-Tyr-Cys-NH₂
78. H-Ile-Ser-Arg-Cys-Ala-Val-Ser-Tyr-Gln-Cys-Lys-Val-OH
79. Ac-Ile-Ser-Arg-Cys-Ala-Val-Ser-Tyr-Gln-Cys-Lys-Val-NH₂
80. H-Cys-His-Thr-Ile-Ser-Arg-Ile-Ala-Val-Ser-Tyr-Gln-Thr-Lys-Val-Asn-Leu-Leu-Ser-Ala-Cys-NH₂
-
81. Ac-Cys-His-Thr-Ile-Ser-Arg-Ile-Ala-Val-Ser-Tyr-Gln-Thr-Lys-Val-Asn-Leu-Leu-Ser-Ala-Cys-NH₂

Beispiel 82

Ac-Orn-Val-Ser-Tyr-Asp-NH₂

0,53 g Boc-Asp(OCH₃)-MBHA-Harz (Substitution ~ 0,96 mmol/g), entsprechend einer Ansatzgröße von 0,5 mmol, wurden gemäß A1a mit je 2 mmol

5

Boc-Tyr(Br-Z)-OH
Boc-Ser(Bzl)-OH

Boc-Val-OH
Boc-Orn(Z)-OH

umgesetzt. Nach beendeter Synthese wurde der N-Terminus acetyliert (Ausführung der Schritte 1 - 6 und 14 - 16 gemäß AIIa). Das erhaltene Peptidharz wurde in Vakuum getrocknet; die Ausbeute betrug 1,03 g.

5 250 mg des nach HF-Spaltung gemäß AII erhaltenen Rohproduktes (305 mg) wurden in 350 ml entgastem DMF gelöst, mit 0,3 ml Triethylamin und bei -25°C mit 0,3 ml Diphenylphosphorylazid versetzt. Die Mischung wurde 2 h bei -25°C gerührt, 2 h bei -25°C, 2 Tage bei 4°C und 2 Tage bei Raumtemperatur aufbewahrt und anschließend zur Trockene eingedampft. Das 10 Rohpeptid wurde durch Gelchromatographie (SEPHADEX® G-15) gereinigt. Es wurden 51 mg Reinprodukt erhalten.

Beispiel 83



1 g Harz nach Breipohl et al. (Fa. BACHEM), entsprechend einer Ansatzgröße 15 von 0,5 mmol wurde gemäß AIIb mit je 2 mmol

Fmoc-Asp(OtBu)-OH	Fmoc-Val-OH
Fmoc-Gln-OH	Fmoc-Ala-OH
Fmoc-Tyr(tBu)-OH	Fmoc-Lys(Boc)-OH
20 Fmoc-Ser(tBu)-OH	

umgesetzt. Nach beendeter Synthese wurde der N-Terminus acetyliert (Ausführung der Schritte 2 - 4 und 8 - 9 gemäß AIIb). Das Peptidharz wurde im Vakuum getrocknet; Ausbeute 1,55 g.

25 Das nach der TFA-Spaltung gemäß AIII erhaltenen Rohprodukt (335 mg) wurde in 500 ml entgastem DMF gelöst, mit 0,3 ml Triethylamin und bei -25°C mit 0,3 ml Diphenylphosphorylazid versetzt. Die Mischung wurde 2 h bei -25°C gerührt, 2 Tage bei -25°C, 2 Tage bei 4°C und 2 Tage bei Raumtemperatur 30 aufbewahrt und anschließend zur Trockene eingedampft. Das Rohpeptid wurde durch Gelchromatographie (SEPHADEX® LH 20) gereinigt. Es wurden 127 mg Reinprodukt erhalten.

Beispiel 84

5,7 g Fmoc-Lys(Boc)-Merrifield-Harz (Substitution ~ 0,35 mmol/g)
5 entsprechend einer Ansatzgröße von 2 mmol, wurden gemäß AIB mit je 8 mmol

Fmoc-Gln-OH
Fmoc-Tyr(tBu)-OH
Fmoc-Ser-(Bzl)-OH

Fmoc-Val-OH
Fmoc-Ala-OH
Fmoc-Asp(OtBu)-OH

10 umgesetzt.

Anschließend wurden die t-Butyl- und Boc-Schutzgruppen abgespalten
(Ausführung der Schritte 1-6 gemäß AII). Die Zyklisierung am Harz erfolgte
15 in NMP unter Zugabe von 3,54 g BOP und 3,5 ml Diisopropylethylamin (16 h).
Das Peptidharz wurde N-terminal entschützt (Ausführung der Schritte 2-4
gemäß AIB) und im Vakuum getrocknet. Die Ausbeute betrug 6,4 g.

Das nach HF-Spaltung gemäß AII erhaltene Rohprodukt wurde durch Gel-
20filtration (Sephadex® G-15) und Mitteldruckchromatographie (vgl. AIV;
10-30 %; 0,25 min⁻¹) gereinigt. Es wurden 23 mg Reinprodukt erhalten.

Analog Beispiel 83 und 84 lassen sich herstellen:

85. Ac-Asp-Val-Ser-Tyr-Lys-NH₂

86. Ac-Lys-Val-Ser-Tyr-Asp-NH₂

87. Ac-Lys-Val-Ser-Tyr-Asp-OH

88. Ac-Glu-Val-Ser-Tyr-Lys-NH₂

89. Ac-Glu-Val-Ser-Tyr-Lys-OH

90. H-Asp-Val-Ser-Tyr-Lys-OH

91. Ac-Lys-Val-Ser-Tyr-Glu-NH₂

92. Ac-Glu-Val-Ser-Tyr-Orn-NH₂

93. Ac-Asp-Val-Ser-Tyr-Orn-NH₂

94. Ac-Asp-Gly-Ser-Tyr-Orn-NH₂

95. Ac-Dap-Val-Ser-Tyr-Asp-NH₂

96. Ac-Asp-Val-Ser-Tyr-Dap-NH₂
97. Ac-Dap-Val-Ser-Tyr-Glu-NH₂
98. Ac-Glu-Val-Ser-Tyr-Dap-NH₂
99. Ac-Asp-Ala-Val-Ser-Tyr-Gln-Lys-NH₂
100. Ac-Asp-Ala-Val-Ser-Tyr-Gln-Lys-OH
101. Ac-Lys-Gly-Val-Ser-Tyr-Gln-Asp-NH₂
102. Ac-Lys-Gly-Val-Ser-Tyr-Gln-Asp-OH
103. Ac-Asp-Ala-Val-Ser-Tyr-Gln-Orn-NH₂
104. Ac-Orn-Ala-Val-Ser-Tyr-Gln-Asp-NH₂
105. Ac-Arg-Ile-Asp-Val-Ser-Tyr-Lys-Thr-Lys-NH₂
106. H-Lys-Val-Gln-Tyr-Asp-OH
107. Ac-Lys-Val-Gln-Tyr-Asp-NH₂
108. Ac-Ile-Lys-Val-Ser-Tyr-Glu-Thr-NH₂
109. Ac-Ile-Lys-Val-Ser-Tyr-Glu-Thr-OH
110. Ac-Asp-Ile-Ser-Tyr-Orn-NH₂
111. Ac-Ile-Ser-Arg-Asp-Ala-Val-Ser-Tyr-Gln-Lys-Lys-Val-Asn-NH₂
112. Ac-Orn-Ala-D-Val-Ser-Tyr-Gln-Asp-NH₂

Beispiel 113[Ala-Val-Ser-Tyr-Gln-Abs]

0,5 g Boc-Abs-Merrifieldharz (Substitution ~ 1 mmol/g), entsprechend einer Ansatzgröße von 0,5 mmol, wurde gemäß A1a mit je 2 mmol

5 Boc-Gln-OH

Boc-Val-OH

Boc-Tyr(Br-Z)-OH

Boc-Ala-OH

Boc-Ser(Bzl)-OH

umgesetzt. Nach beendet Synthese wurde das Peptidharz N-terminal
10 entschützt (Ausführung der Schritte 1 - 3 gemäß A1a) und anschließend im
Vakuum getrocknet. Die Ausbeute betrug 0,91 g.

Das nach HF-Spaltung gemäß AII erhaltene Rohprodukt (290 mg) wurde in 500 ml entgastem DMF gelöst. Nach Zugabe von 210 mg NaHCO₃ und 660 mg BOP wurde 3 Tage bei Raumtemperatur gerührt. Dann wurde zur Trockene eingedampft, und das Rohpeptid durch Gelchromatographie (SEPHADEX® LH 20) 5 gereinigt. Es wurden 138 mg Reinprodukt erhalten.

Beispiel 114

[Tyr-Gln-Thr-Lys-Arg-Ile-Ala-Val-Ser]

1,11 g Fmoc-Ser(t-Bu)-p-Alkoxybenzylalkohol-Harz (Substitution - 0,45 mmol/g), entsprechend einer Ansatzgröße von 0,5 mmol, 10 wurde gemäß AIB mit je 2 mmol

Fmoc-Val-OH	Fmoc-Lys(Z)-OH
Fmoc-Ala-OH	Fmoc-Thr(tBu)-OH
Fmoc-Ile-OH	Fmoc-Gln-OH
15 Fmoc-Arg(Tos)-OH	Fmoc-Tyr(tBu)-OH

umgesetzt. Nach beendeter Synthese wurde das Peptidharz N-terminal entschützt (Ausführung der Schritte 2 - 4 gemäß AIB) und anschließend im Vakuum getrocknet. Die Ausbeute betrug 1,8 g.

20

Das nach TFA-Spaltung gemäß AIII erhaltene Rohpeptid wurde in 500 ml entgastem DMF gelöst. Nach Zugabe von 210 mg NaHCO₃ und 660 mg BOP wurde 3 Tage bei Raumtemperatur gerührt. Dann wurde zur Trockene eingedampft und das Rohpeptid durch Gelchromatographie (SEPHADEX® LH 20) gereinigt. Das 25 isolierte Monomere (219 mg) wurde gemäß A II entschützt und durch Mitteldruckchromatographie (vgl. AIV; 40 - 60 % A; 0,25 % min⁻¹) gereinigt. Es wurden 68 mg Reinprodukt erhalten.

Analog Beispiel 113 und 114 lassen sich herstellen:

30 115. Ile-Ala-Val-Ser-Tyr-Gln-Thr

116. Arg-Ile-Gly-Val-Ser-Tyr-Gln-Thr-Lys

117. Ser-Ile-Ala-Val-Ser-Tyr-Gln-Thr-Lys-Val

118. Ala-Val-Ser-Tyr-Gln-Gly

119. Ala-Val-Ser-Tyr-Gln-Bal

120. Ala-Val-Ser-Tyr-Gln-D-Ala

Ala-Val-Ser-Tyr-Gln-Thr-Lys-D-Ala-Arg-Ile

121. Ile-Ala-Val-Ser-Tyr-Gln-Thr-D-Pro
Ala-Val-Ser-Tyr-Gln-D-Pro
122. Gly-Val-Ser-Tyr-Gln-Abs
123. Ala-Val-Ser-D-Tyr-Gln
124. Gly-Val-Ser-Tyr-Gln-Thr
125. Arg-Ile-Ser-Val-Ser-Tyr-Gln-Thr-Lys
126. Ile-Ala-Val-D-Ser-Tyr-Gln-Thr
127. Ile-Ala-Val-Ser-Tyr-Gln-Thr-D-Ala

Patentansprüche

1. Gegenstand der Erfindung sind Peptide der Formel I,

5

X-A-B-Tyr-Y

I,

worin

A Ser, Val, Ile oder Pro ist,

10

B Gln oder Ser bedeutet,

x für eine Gruppe G-NH-CHM-CO-, G-NH-CHM-CO-W-, G-R-NH-CHM-CO- oder
G-R-NH-CHM-CO-W- und

15

y für eine Gruppe -Z, -NH-CHQ-CO-Z, -V-NH-CHQ-CO-Z, -NH-CHQ-CO-U-Z
oder -V-NH-CHQ-CO-U-Z steht,

wobei in X und Y

20

G ein Wasserstoffatom oder eine Aminoschutzgruppe bedeutet,

Z für eine OH- oder NH₂-Gruppe oder eine Carboxylschutzgruppe

25

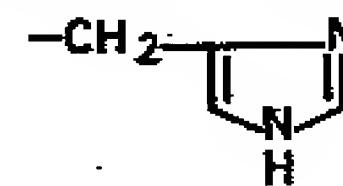
steht oder

G und Z zusammen auch eine kovalente Bindung oder die Gruppe
-CO-(CH₂)_a-NH- bedeuten, wobei a eine Zahl von 1 bis 12 ist,

30

R, U, V und W Peptidketten aus 1-4 natürlich vorkommenden
α-Aminosäuren darstellen und

M und Q Wasserstoffatome oder eine der Gruppen

-CH(CH₃)₂, -CH(CH₃)-C₂H₅, -C₆H₅, -CH(OH)-CH₃,oder -(CH₂)_b-T

35

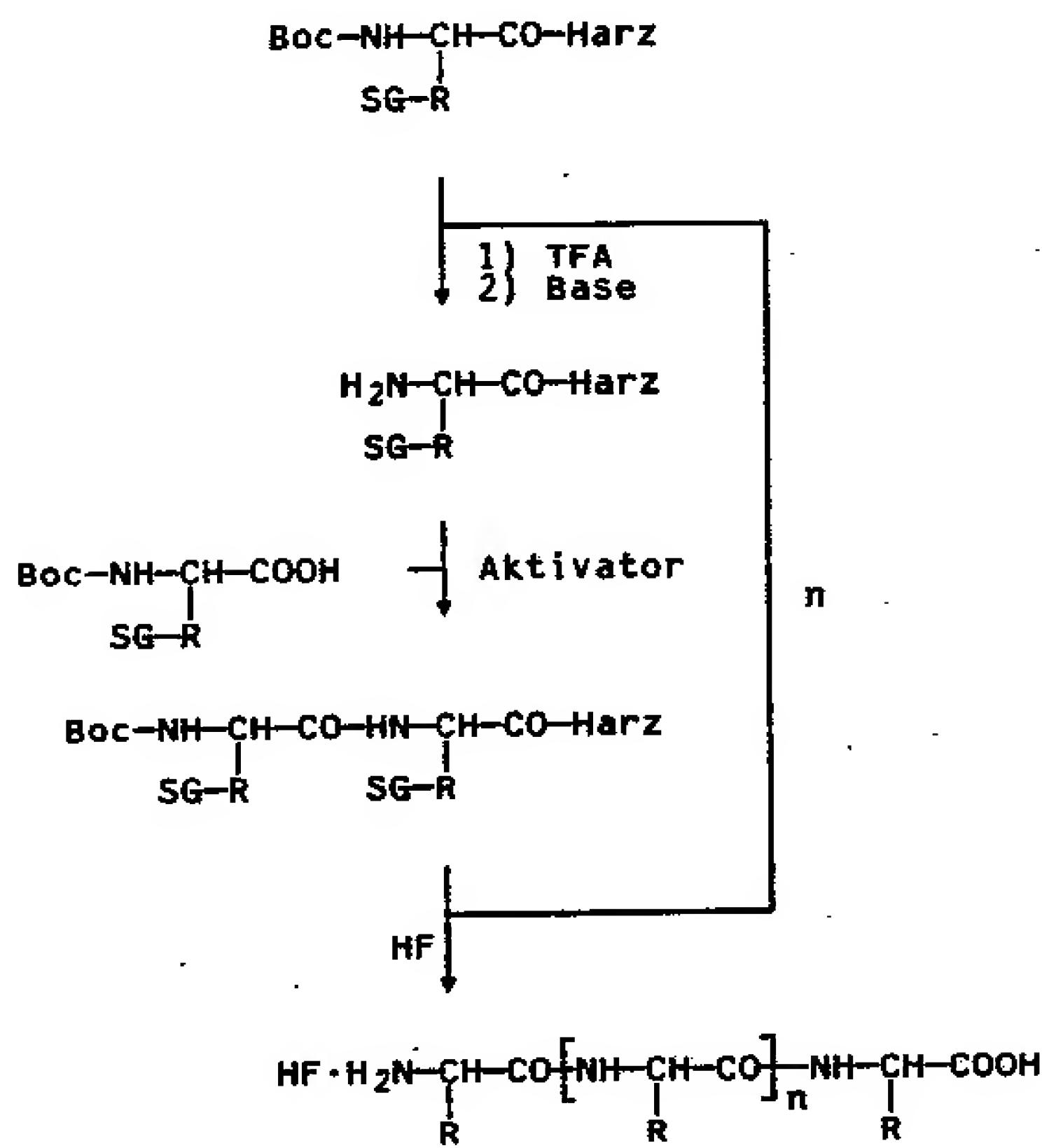
(mit b in der Bedeutung einer Zahl von 1 bis 6 und T in der
Bedeutung eines Wasserstoffatoms oder einer OH-, CH₃O-,
CH₃S-, (CH₃)₂CH-, C₆H₅-, p-HO-C₆H₄-, HS-, H₂N-, HO-CO-,
H₂N-CO-, H₂N-C(=NH)-NH-Gruppe) oder

40

Abb.

1/2

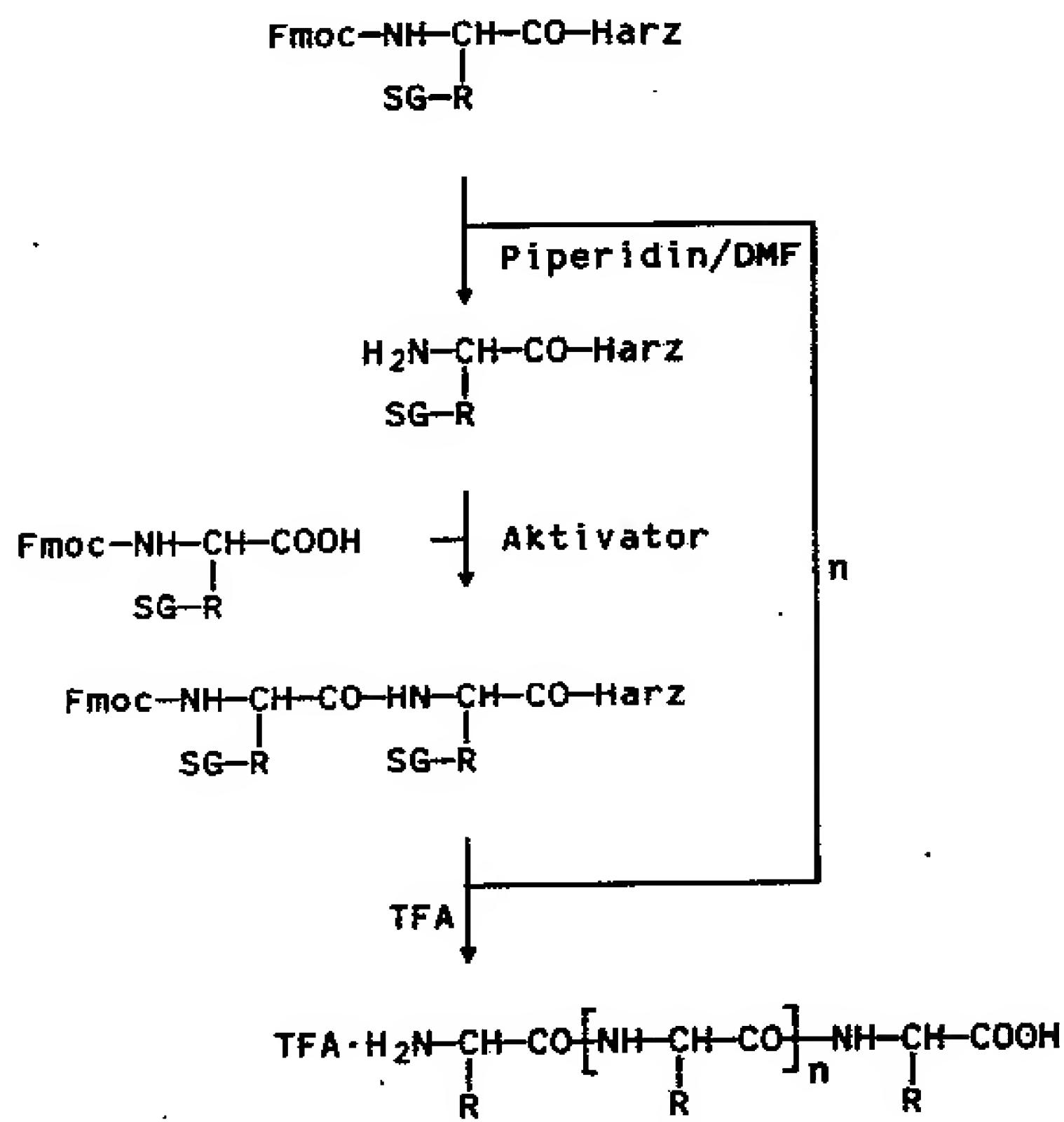
Abb. 1: Die Boc-Schutzgruppentechnik am polymeren Träger

**Boc** = t-Butyloxycarbonyl-Schutzgruppe**SG** = Seitenketten-Schutzgruppe

5 R.. = Aminosäure-Seitenkette

2/2

Abb. 2: Die Fmoc-Schutzgruppentechnik am polymeren Träger



Fmoc = 9-Fluorenylmethyloxycarbonyl-Schutzgruppe

SG = Seitenketten-Schutzgruppe

5 R = Aminosäure-Seitenkette

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No.

PCT/EP 89/01474

I. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER (if several classification symbols apply, indicate all) *

According to International Patent Classification (IPC) or to both National Classification and IPC

Int.Cl⁵ : C 07 K 7/06, 7/08, 7/10, 7/56, 7/64//A 61 K 37/02

II. FIELDS SEARCHED

Minimum Documentation Searched ?

Classification System	Classification Symbols
Int.Cl ⁵	C 07 K; C 12 N

Documentation Searched other than Minimum Documentation
to the Extent that such Documents are Included in the Fields Searched *

III. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT *

Category *	Citation of Document, ** with indication, where appropriate, of the relevant passages ***	Relevant to Claim No. 12
X	WO,A1,87/07614 (CANDACE B.PERT ET AL.) 17 December 1987, see the whole document	1,2,6
P,X	EP,A1,0306515 (IMMUNETECH PHARMACEUTICALS, INC.) 08 March 1989, see page 5	1,2

* Special categories of cited documents: **

- "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
- "E" earlier document but published on or after the international filing date
- "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
- "D" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
- "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

- "T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
- "X" document of particular relevance: the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step
- "Y" document of particular relevance: the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art.
- "Z" document member of the same patent family

IV. CERTIFICATION

Date of the Actual Completion of the International Search
09 March 1990 (09.03.90)

Date of Mailing of this International Search Report
20 March 1990 (20.03.90)

International Searching Authority

EUROPEAN PATENT OFFICE

Signature of Authorized Officer

FURTHER INFORMATION CONTINUED FROM THE SECOND SHEET

V. OBSERVATIONS WHERE CERTAIN CLAIMS WERE FOUND UNSEARCHABLE:

This International search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2) (a) for the following reasons:
1. Claim numbers ..., because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:

Method for treatment of the human or animal body by therapy.

Rule 39(IV)

2. Claim numbers ..., because they relate to parts of the International application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful International search can be carried out, specifically:

3. Claim numbers ..., because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of PCT Rule 6.4(a).

VI. OBSERVATIONS WHERE UNITY OF INVENTION IS LACKING:

This International Searching Authority found multiple inventions in this International application as follows:

1. As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this International search report covers all searchable claims of the International application.

2. As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this International search report covers only those claims of the International application for which fees were paid, specifically claims:

3. No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this International search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claim numbers:

4. As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fee, the International Searching Authority did not invite payment of any additional fee.

Remark on Protest

- The additional search fees were accompanied by applicant's protest.
- No protest accompanied the payment of additional search fees.

ANNEX TO THE INTERNATIONAL SEARCH REPORT
ON INTERNATIONAL PATENT APPLICATION NO.

PCT/EP 89/01474

SA 32748

This annex lists the patent family members relating to the patent documents cited in the above-mentioned international search report.
The members are as contained in the European Patent Office EPO file on 08/11/89.
The European Patent Office is in no way liable for these particulars which are merely given for the purpose of information.

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO-A1- 87/07614	17/12/87	EP-A- 0249390 EP-A- 0249394 WO-A- 87/07613 AU-D- 75108/87 AU-D- 75149/87	16/12/87 16/12/87 17/12/87 11/01/88 11/01/88
EP-A1- 0305615	08/03/89	US-A- 4692511	08/09/87

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Internationales Aktenzeichen

PCT/EP 89/01474

I. KLASSEFIKATION DES ANMELDUNGSGEGENSTANDS (bei mehreren Klassifikationssymbolen sind alle anzugeben:⁶)

Nach der Internationalen Patentklassifikation (IPC) oder nach der nationalen Klassifikation und der IPC 5
Int. Cl. C 07 K 7/06, 7/08, 7/10, 7/56, 7/64//A 61 K 37/02

II. RECHERCHIERTE SACHGEBIETE

Recherchierte Mindestpräfertstoff⁷

Klassifikationssystem	Klassifikationssymbole
Int. Cl.	C 07 K; C 12 N

Recherchierte nicht zum Mindestpräfertstoff gehörende Veröffentlichungen, soweit diese unter die recherchierten Sachgebiete fallen⁸

III. EINSCHLÄGIGE VERÖFFENTLICHUNGEN⁹

Art*	Kennzeichnung der Veröffentlichung ¹¹ , soweit erforderlich unter Angabe der maßgeblichen Teile ¹²	Betr. Anspruch Nr. ¹³
X	WO, A1, 87/07614 (CANDACE B. PERT ET AL.) 17 Dezember 1987, siehe das ganze Dokument --	1,2,6
P,X	EP, A1, 0305615 (IMMUNETECH PHARMACEUTICALS, INC.) 8 März 1989, siehe Seite 5 --	1,2

* Besondere Kategorien von angegebenen Veröffentlichungen¹⁰:
 "A" Veröffentlichung, die den allgemeinen Stand der Technik definiert, aber nicht als besonders bedeutsam anzusehen ist
 "E" älteres Dokument, das jedoch erst am oder nach dem internationalen Anmeldedatum veröffentlicht worden ist
 "L" Veröffentlichung, die geeignet ist, einen Prioritätsanspruch zweifelhaft erscheinen zu lassen, oder durch die das Veröffentlichungsdatum einer anderen im Recherchenbericht genannten Veröffentlichung belegt werden soll oder die aus einem anderen besonderen Grund angegeben ist (wie ausgeführt)
 "O" Veröffentlichung, die sich auf eine mündliche Offenbarung, eine Benutzung, eine Ausstellung oder andere Maßnahmen bezieht
 "P" Veröffentlichung, die vor dem internationalen Anmeldedatum, aber nach dem beanspruchten Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist

"T" Spätere Veröffentlichung, die nach dem internationalen Anmeldedatum oder dem Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist und mit der Anmeldung nicht kollidiert, sondern nur zum Verständnis des der Erfindung zugrundeliegenden Prinzips oder der ihr zugrundeliegenden Theorie angegeben ist
 "X" Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann nicht als neu oder auf erfinderischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden
 "Y" Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann nicht als auf erfinderischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden, wenn die Veröffentlichung mit einer oder mehreren anderen Veröffentlichungen dieser Kategorie in Verbindung gebracht wird und diese Verbindung für einen Fachmann naheliegend ist
 "&" Veröffentlichung, die Mitglied derselben Patentfamilie ist

IV. BESCHEINIGUNG

Datum des Abschlusses der internationalen Recherche	Absendedatum des internationalen Recherchenberichts
9. März 1990	20. 03. 90
Internationale Recherchenbehörde Europäisches Patentamt	Unterschrift des bevollmächtigten Bediensteten T.K. WILLIS

WEITERE ANGABEN ZU BLATT 2**V. BEMERKUNGEN ZU DEN ANSPRÜCHEN, DIE SICH ALS NICHT RECHERCHIERBAR ERWIESEN HABEN¹**

Gemäß Artikel 17 Absatz 2 Buchstabe a sind bestimmte Ansprüche aus folgenden Gründen nicht Gegenstand der internationalen Recherche gewesen:

1. Ansprüche Nr., weil sie sich auf Gegenstände beziehen, die zu recherchieren die Behörde nicht verpflichtet ist, nämlich Verfahren zur therapeutischen Behandlung des menschlichen oder tierischen Körpers. Regel 39(iv).
2. Ansprüche Nr., weil sie sich auf Teile der internationalen Anmeldung beziehen, die den vorgeschriebenen Anforderungen so wenig entsprechen, daß eine sinnvolle internationale Recherche nicht durchgeführt werden kann, nämlich
3. Ansprüche Nr., weil sie abhängige Ansprüche und nicht entsprechend Satz 2 und 3 der Regel 6.4 a) PCT abgefaßt sind.

Vt. BEMERKUNGEN BEI MANGELNDER EINHEITLICHKEIT DER ERFINDUNG²

Die internationale Recherchenbehörde hat festgestellt, daß diese internationale Anmeldung mehrere Erfindungen enthält:

1. Da der Anmelder alle erforderlichen zusätzlichen Recherchengebühren rechtzeitig entrichtet hat, erstreckt sich der internationale Recherchenbericht auf alle recherchierbaren Ansprüche der internationalen Anmeldung.
 2. Da der Anmelder nur einige der erforderlichen zusätzlichen Recherchengebühren rechtzeitig entrichtet hat, erstreckt sich der internationale Recherchenbericht nur auf die Ansprüche der internationalen Anmeldung, für die Gebühren gezahlt worden sind, nämlich
 3. Der Anmelder hat die erforderlichen zusätzlichen Recherchengebühren nicht rechtzeitig entrichtet. Der internationale Recherchenbericht beschränkt sich daher auf die in den Ansprüchen zuerst erwähnte Erfindung; sie ist in folgenden Ansprüchen erfaßt;
 4. Da für alle recherchierbaren Ansprüche eine Recherche ohne einen Arbeitsaufwand durchgeführt werden konnte, der eine zusätzliche Recherchengebühr gerechtfertigt hätte, hat die internationale Recherchenbehörde eine solche Gebühr nicht verlangt.
- Bemerkung hinsichtlich eines Widerspruchs:
- Die zusätzlichen Gebühren wurden vom Anmelder unter Widerspruch gezahlt.
 Die Zahlung zusätzlicher Gebühren erfolgte ohne Widerspruch.

**ANHANG ZUM INTERNATIONALEN RECHERCHENBERICHT
ÜBER DIE INTERNATIONALE PATENTANMELDUNG NR.**

PCT/EP 89/01474

SA 32748

In diesem Anhang sind die Mitglieder der Patentfamilien der im obengenannten internationalen Recherchenbericht angeführten Patentdokumente angegeben.

Die Angaben über die Familienmitglieder entsprechen dem Stand der Datei des Europäischen Patentamts am 08/11/89.

Diese Angaben dienen nur zur Orientierung und erfolgen ohne Gewähr.

Im Recherchenbericht angeführtes Patentdokument	Datum der Veröffentlichung	Mitglied(er) der Patentfamilie	Datum der Veröffentlichung
WO-A1- 87/07614	17/12/87	EP-A- 0249390 EP-A- 0249394 WO-A- 87/07613 AU-D- 75408/87 AU-D- 75449/87	16/12/87 16/12/87 17/12/87 11/01/88 11/01/88
EP-A1- 0305615	08/03/89	US-A- 4692511	08/09/87